

牛 *GDF-9* 基因的克隆与组织表达的分析

田 蕾¹, 刘永斌^{1,2}, 王 峰^{1,2}, 田春英², 刘美霞³, 达 赖²,
祁云霞¹, 董文杰¹, 荣威恒², 孙洪深⁴

(1. 内蒙古农业大学 动物科学与医学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古农牧业科学院, 内蒙古 呼和浩特 010030;
3. 内蒙古医学院第二附属医院, 内蒙古 呼和浩特 010010; 4. 山东省巨野县畜牧局, 山东 巨野 274900)

摘要: 为了检测牛 *GDF-9* 基因 mRNA 在怀孕期牛生殖系统的表达情况, 为 *GDF-9* 基因在雌性动物繁殖上的研究提供一定的理论依据。本试验根据 GenBank 中报道的牛 *GDF-9* 基因序列设计引物, 从牛卵巢、输卵管、子宫、肾脏中提取 RNA, 采用 RT-PCR 技术进行 cDNA 扩增, 扩增产物与载体 pGM-T 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆, 测序。结果表明, 已成功克隆的阳性重组子测序鉴定其片段大小与预期大小完全一致, 为 264 bp。序列同源性分析比较表明, 该 cDNA 及其推导的氨基酸序列与绵羊 *GDF-9* cDNA 和氨基酸序列同源性分别为 97% 和 94%。以 β -actin 为内参照物, 采用 RF-PCR 技术进行半定量分析, 通过检测比较牛 *GDF-9* 基因在卵巢、输卵管、子宫、肾脏组织中 mRNA 的表达情况。结果表明, 牛 *GDF-9* 基因在卵巢中表达量最高, 在输卵管、子宫、肾脏中均有表达, 但表达量不高。

关键词: 牛; *GDF-9*; RT-PCR; 克隆; mRNA; 表达

中图分类号: S823.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)04-0067-04

The Clone and Tissue Expression of Bovine Growth Differentiation Factors-9 Gene

TIAN Lei¹, LIU Yong bin^{1,2}, WANG Feng^{1,2}, TIAN Chuan ying², LIU Mei xia³, DA Lai²,
QI Yun xia¹, DONG Wen jie¹, RONG Wei heng², SUN Hong shen⁴

(1. College of Animals Science and Medicine, Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010018, China; 2. Inner Mongolia Academy of Agriculture and Husbandary Sciences, Huhhot 010030, China; 3. The Second Accessory Hospital, Academy of Inner Mongolia Medicine Science, Huhhot 010010, China; 4. Juye Animal Bureau, Juye 274900, China)

Abstract: In order to offer more theory of female reproductive performance, the expression of *GDF-9* gene mRNA at the period of pregnancy bovine was detected. First, total RNA was isolated from the bovine ovaries, and the primers were designed according to the GenBank, cDNA was amplified with RT-PCR, then cloned into Excoli DH5 α by using pGM-T vector. Sequence analysis showed that the cloned 264 bp cDNA and the deduced amino acid sequence shared 97% and 94% homology respectively with ovine *GDF-9* cDNA. According to β -actin as inner Criteria, then the mRNA of *GDF-9* gene were examined with RT-PCR. The result indicated that *GDF-9* expressed in the bovine ovaries, oviduct, uterus and kidney, and the largest is in ovaries.

Key words: Bovine; *GDF-9*; RT-PCR; Clone; mRNA expression

生长分化因子-9(Growth differentiation factors-9, *GDF-9*)是TGF- β 超家族中的一员,是由卵母细胞分泌的一种生长因子,它通过旁分泌方式对早期卵泡的生长和分化起着重要调节作用^[1,2]。*GDF-9*能诱导腔前卵泡生长,且与FSH一起使用时对卵泡生长起加性作用,对卵巢的颗粒细胞、膜细胞也起重要作用。

*GDF-9*基因特异地在人、啮齿类动物以及反刍家畜卵母细胞中表达,它对卵巢卵泡的发育起着关键的调节作用。*GDF-9*可以促进原始卵泡向初级卵泡发育,*GDF-9*的缺失使初级卵泡不能形成,从而导致雌性不育,同时*GDF-9*基因还可以与其他激素生长因子(如:*GDF-9B*, FSH, *FecX1*)协同作用^[3,4]。

收稿日期: 2007-03-30

基金项目: 内蒙古科技攻关项目(20040102); 内蒙古自然科学基金资助项目(200607010410); 畜禽种质资源项目(2005DKA21101)

作者简介: 田 蕾(1982-),女,内蒙古太仆寺旗人,硕士,主要从事分子遗传学与牛羊育种研究工作

通讯作者: 刘永斌(1977-),男,内蒙古人,在读博士,主要从事分子生物学与动物育种研究工作。

故对 *GDF-9* 基因结构的分子克隆及生物功能分析, 有利于进一步理解其在卵巢的生理学和发育学方面所起的作用, 可以为提高肉牛的繁殖力另辟一条新路, 为治疗人类的不育症提供有力的依据^[5]。本研究利用在 Genbank 已有的序列, 根据比对后的保守区设计引物, 通过 RT-PCR 技术获得牛生长因子基因的部分 cDNA 序列, 同时分析 *GDF-9* 基因在牛卵巢、输卵管、子宫、肾脏组织中的表达情况, 以期确定 *GDF-9* 基因在牛不同生殖发育阶段所起的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物及菌种 1 只成年母牛屠宰后立即采集其卵巢、输卵管、子宫、肾脏组织放入已处理好的冻存管内, 投入液氮内备用。受体菌 TOP10, pGM-TVector 购于北京天为时代科技有限公司。

1.1.2 试验试剂 Trizol 试剂盒, 购于 Invitrogen。RNA LA-PCR Kit(AMV)、DNA Marker DL 2000、LA Taq DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶, 购于大连宝生物公司。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒快速提取试剂盒、琼脂糖、X-gal、IPTG、pGM-T 载体试剂盒、限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III, 购自北京天为时代。

1.1.3 PCR 引物设计 根据 GenBank 中牛 *GDF-9* 基因部分序列和小鼠、绵羊、人的 *GDF-9* 基因序列, 利用生物学软件 DNASTar 进行基因序列的同源性比较, 得出 *GDF-9* 基因 cDNA 序列的保守区。根据该 cDNA 保守区和引物设计原则, 设计 1 对 PCR 引物。上游引物 P1: 5'-ATG CAA CCT GGT GAT AAA AGA G-3' 下游引物 P2: 5'-GAG GGC GCT AAG AGA AGA GTC AT-3' 引物, 预期扩增片断为 264 bp。牛 β -actin 上游引物 P3: 5'-AGA ACT ACG CCA CGA AAC CTT CCT-3'; 下游引物 P4: 5'-AAT ATT CCG CCG TGT GTT CCA GC-3', 预期扩增片段为 326 bp。

1.2 方法

1.2.1 组织总 RNA 提取 整个试验所用的金属器械及玻璃器皿 180℃ 以上烘烤 4 h, 所用的塑料耗材及配制的试剂用 0.1% 的 DEPC 水处理 12~16 h, 然后高温消毒, 除去 RNA 酶。分别取重量约为 100 mg 牛卵巢、输卵管、子宫、肾脏组织, 组织经研钵研碎后, 按 Trizol 试剂盒说明书操作, 最后用无 RNase 去离子水溶解 RNA 沉淀, -70℃ 保存。

1.2.2 RT-PCR 扩增目的 DNA 反转录反应体系 20 μ L: 总 RNA 5 μ L, 10 \times RNA PCR Buffer 2 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 4 μ L, dNTP Mixture (10 mmol/L) 2 μ L, RNase Inhibitor (40 U/ μ L) 0.5 μ L, AMV Reverse Trarr

scriptase XL (5 U/ μ L) 1 μ L, OligodT 3 site adaptor Primer (2.5 μ mol/ μ L) 1 μ L。所有反应混匀后室温放置 10 min, 45℃ 反转录 45 min, 然后以 cDNA 为模板, 进行目的 DNA 扩增, 反应 50 μ L 体系: cDNA 10 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, P1 (20 pmol/ μ L) 0.5 μ L, P2 (20 pmol/ μ L) 0.5 μ L, LA TaqDNA 聚合酶 (5 U) 0.25 μ L, ddH₂O 34 μ L。反应条件: 94℃ 3 min, 然后 94℃ 30 s, 50.8℃ 30 s, 72℃ 1 min 循环 30 次, 72℃ 7 min。阴性对照管中不加反转录酶, 取 PCR 产物 5 μ L 直接上样于 1.2% 的琼脂糖凝胶板进行电泳, 溴化乙锭染色, 凝胶成像仪上观察结果并照相。

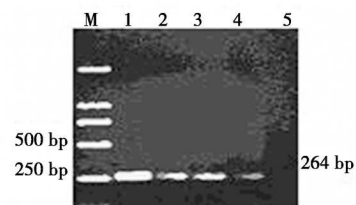
1.3 PCR 产物的克隆、鉴定及测序

琼脂糖凝胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物, 按克隆策略和 pGM-T 载体试剂盒说明, 回收产物与 1 μ L T 载体混匀, 加入 T₄ DNA 连接酶及缓冲液, 22℃ 连接 4 h。连接反应产物转化宿主菌 TOP10 感受态细胞, 加氨苄的 LB 培养基铺板过夜, 在含氨苄青霉素和 IPTG、X-gal 的选择平板上, 筛选白色菌落。挑取白斑菌落, 少量提取重组质粒。重组质粒为模板 PCR 扩增, 鉴定阳性克隆。重组质粒经 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切分析, 再一次鉴定阳性克隆。阳性克隆由大连宝生物公司测序。

2 结果与分析

2.1 目的基因的扩增

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 在位于相对质量 (Mr) 标准 250 bp 附近出现 1 条特异性条带, 与预期大小 (264 bp) 相符 (图 1)。



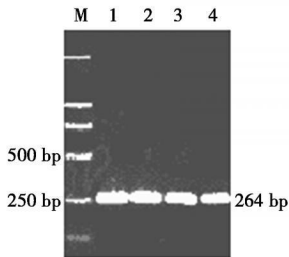
M. DL2000 marker; 1~4 RT-PCR 产物; 5. 阴性对照
M. DL2000 DNA marker; 1~4. RT-PCR product of *GDF-9*;
5. Negative control

图 1 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis analysis of Cow *GDF-9* cDNA RT-PCR product

2.2 重组质粒的鉴定

挑取 7 个转化菌, 培养后提取质粒, 以质粒为模板进行 PCR 扩增, 在 250 bp 处均出现 1 条特异条带, 初步判断为含有目的条带。提取的质粒经 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切图谱分析证实, 含有插入的目的片段 (图 2, 3)。



M. DL2000 DNA marker; 1~ 4. 重组质粒 PCR 扩增产物
M. DL2000 DNA marker; 1~ 4. RT-PCR product of recombinant plasmid

图 2 重组质粒 PCR 扩增分析

Fig. 2 The RT-PCR analysis of recombinant plasmid

2.3 PCR 产物的序列测定

经酶切鉴定和 PCR 鉴定正确的质粒进行 DNA 序列测定, 其测序结果序列(图 4)。

```
1      GAGGCGCTA AGAGAAGAGT CATGTAAAC AGGCTGTCCC GTGCTGAAGG ATGCTGCAGC
61     TGCTCTTTCA CACATGTAAA ATTTACAGAC ATGTGAATAT TCCTCTTTGTG GGAGGCCACC
121    AGAGGCTCAA GAGGAGCTGT CACATCAATC TCAATCCATT TGTATTTCTT TCTAAATTCA
181    AACTGTGACT TAAAGCTAAA TGAGTATGGA GCTCTAGCGA GACTCTTGCT AGAAACTCT
241    GGCTCTTTTA TCACCAGGTT GCAT
```

图 4 牛 *GDF-9* 的测序结果及核苷酸序列

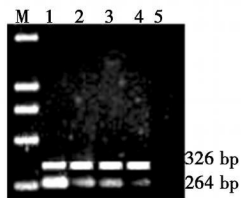
Fig. 4 The nucleotide sequences of cow *GDF-9* gene

2.4 牛 *GDF-9* 基因的 cDNA 与其他动物的比较

应用 GenBank 中的 BLAST 软件进行网上同源性比较, 牛 *GDF-9* cDNA 基因与人、小鼠、绵羊、山羊 cDNA 的相应区域的同源性分别有 86%, 81%, 97% 和 97%。

2.5 牛 *GDF-9* 基因的半定量分析

分别以成年牛卵巢、输卵管、子宫、肾脏提取的总 RNA 为模板, 利用牛 *GDF-9* 基因和 β -actin 的上下游引物进行 RT-PCR 扩增, 产生了预期大小的 264 bp 和 326 bp 目的条带(图 5), 结果表明, *GDF-9* 基因 mRNA 在卵巢中表达最多, 其次为输卵管、子宫、肾脏。肾脏相对表达较少。

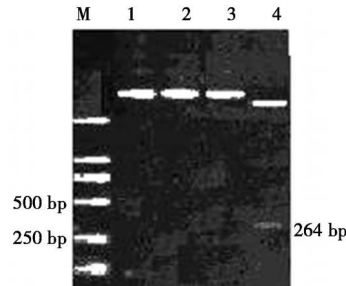


M. DL2000 DNA marker; 1~ 4. 分别为卵巢、输卵管、子宫、肾脏组织的 RT-PCR 产物; 5. 未加反转录酶阴性对照

M. DL2000 DNA marker; 1~ 4. RT-PCR product of *GDF-9* in bovine ovaries, oviduct, uterus and kidney; 5. Negative control

图 5 牛 *GDF-9* 基因在卵巢、输卵管、子宫、肾脏组织表达的 RT-PCR 分析

Fig. 5 The RT-PCR analysis of *GDF-9* expression in bovine ovaries, oviduct, uterus and kidney



M. DL2000 DNA marker; 1~ 3 重组质粒;
4. 重组质粒经 *EcoR* I, *Hind* III 双酶切分析

M. DL2000 DNA marker; 1~ 3. Recombinant plasmid;
4. Recombinant plasmid digested with *EcoR* I, *Hind* III

图 3 重组质粒限制性酶切分析

Fig. 3 The RT-PCR analysis of recombinant plasmid

3 讨论

检测和分析组织或细胞中的基因表达水平常用的方法有原位杂交、Northern 印迹杂交、RNA 打点杂交、S1 核酸酶和核酸酶 A 保护分析法等, 这些方法除原位杂交比较敏感外, 其他的方法均需要较多的样品量。而 RT-PCR 将 mRNA 分子的 cDNA 序列进行扩增, 从而为用非常少量的模板分析 RNA 提供了可能。现在 RT-PCR 以其灵敏度高、专一性好、快速简单等特点, 作为 mRNA 测定方法日益得到大家的认可, 已广泛地用于科研中基因表达水平的检测, 为广大从事基因研究的科研人员及研究生提供了帮助^[6]。

GDF-9 是卵泡生长过程中所必需的细胞因子, 对较早期卵泡的正常生长、卵母细胞的有丝分裂、颗粒细胞的增殖、卵丘的膨胀、卵泡膜形成均有促进作用, 作为主要由卵巢分泌的细胞因子, *GDF-9* 对卵母细胞的生长、有丝分裂, 颗粒细胞的增殖及卵泡膜层的形成、雌、孕、雄激素的合成具有重要作用, 与 FSH 协同刺激卵泡的生长, 故其在卵泡发育, 尤其是较早期卵泡发育过程中所起的作用是必不可少的^[7]。卵泡的发育是一个复杂而精细的过程, 除了受下丘脑、垂体分泌的相关激素水平调控外, 卵巢局部分泌的细胞因子起着不可忽视的调节作用。*GDF-9* 的表达缺陷势必引起卵泡发育的障碍, 从而导致性激素分

泌的紊乱。

据报道^[8-11]GDF-9 主要在卵母细胞表达,在灵长类动物卵巢颗粒细胞也可见表达,在 小鼠辜丸、子宫、垂体、骨髓等也有 *GDF-9* 的表达。在啮齿类,从早期的窦前卵泡至成熟前卵泡的卵母细胞中均有 *GDF-9* 表达。本试验通过 RT-PCR 半定量分析得出,牛 *GDF-9* 基因 mRNA 在卵巢、输卵管、子宫、肾脏中均有表达,并且在卵巢中表达量高,而在输卵管、子宫、肾脏中的表达相对较少。

参考文献:

- [1] Yan C N, Wang P, DeMayo J, *et al.* Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function[J]. 2001, 15(6): 854- 866.
- [2] 吴泽辉. 生长分化因子 9 基因及其在生殖中的作用[J]. 遗传, 2005, 27(3): 481- 486.
- [3] Sendai Y, Itoh T, Yamashita S, *et al.* Molecular cloning of a cDNA encoding a bovine growth differentiation factor 9(GDF-9) and expression of GDF-9 in bovine ovarian oocytes and vitroproduced embryos[J]. Cloning, 2001, 3(1): 3- 10.
- [4] Eckery D C, Whale L J. Expression of mRNA encoding growth

differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 during follicular formation and growth in a marsupial, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) [J]. Mol Cell Endocrinol, 2002, 192(122): 115- 126

- [5] 李碧侠. 生长分化因子 9 基因的研究进展[J]. 国外畜牧科技, 2002, 29(6): 33- 36.
- [6] 胡庆宏. RT-PCR 半定量在基因表达水平检测中的应用[J]. 实用临床医学, 2004, 5(6): 6.
- [7] Coucouvanis E, Martin G R. BMP signalling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo [J]. Development, 1999, 126(3): 535.
- [8] Varani S, Elvin J A, Yan C, *et al.* Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor 9, causes female subfertility[J]. Mol Endocrinol 2002, 16: 1154- 1167.
- [9] Elvin J A, Clark A T, Wang P, *et al.* Paracrine actions of growth differentiation factor 9 in the mammalian ovary[J]. Mol Endocrinol, 1999, 13: 1035- 1048.
- [10] Gui L M, Joyce I M. RNA interference evidence that growth differentiation factor 9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice[J]. Biol Reprod, 2005, 72: 195- 199.
- [11] Solovyeva E V, Hayashi M, Margi K, *et al.* Growth differentiation factor 9 stimulates ratheca interstitial cell androgen biosynthesis[J]. Biol Reprod, 2000, 63: 1214- 1218.

《天津农业科学》征订启事

《天津农业科学》是天津市农业科学院信息研究所主办的综合性学术期刊,创刊于 1974 年。主要报道农林、植保、土壤肥料、园艺、畜牧兽医、农产品贮藏加工、水产、花卉、生物技术等方面的基础理论、试验报告、实用技术和专题综述类文章及农业区划、科研管理等软科学论文。开设栏目有:无土栽培与设施园艺、植物保护、植物营养与土壤肥料、畜牧兽医、贮藏加工、生物技术、作物栽培与育种、农业区划、信息技术等。适合各级农业科技人员、农技推广人员、农业行政管理干部、农业大中专院校师生参阅。

本刊为季刊,季末月 25 日出版,大 16 开,64 页。每期定价 5 元,全年 20 元,免费邮寄。国内统一刊号 CN12- 1256/S,全国各地邮局(所)均可订阅,邮发代号 6- 165,如错过订阅时间也可直接汇款至本刊编辑部订阅。

中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据统计源期刊、天津市一级期刊、第四届全国优秀农业期刊。

欢迎投稿、订阅、刊登广告!

地址:天津市南开区白堤路 268 号《天津农业科学》编辑部 邮编:300192

电话/传真:022- 23678601 E-mail: tjnykx@163.com

开户银行:天津市建设银行园区支行

账号:527- 221100261022985- 3

单位名称:天津市农业科学院信息研究所